

MAPK 信号转导通路与破骨细胞

彭文芳 综述 张秀珍 审校

一、破骨细胞

破骨细胞(osteoclast, OC)是由单核/巨噬形成的一种多核细胞,细胞家族中的单核细胞祖细胞融合后形成的一种多核细胞,巨噬细胞变成具有骨吸收能力的 OC 必须要有骨髓基质细胞/成骨细胞(osteoblast, OB)的存在^[1]。骨髓基质细胞/OB 表达两个促进 OC 生成所必须的分子:一个是巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF),另一个是激活核因子 NF- κ B 受体的配体(receptor activator of nuclear kappa B ligand, RANKL)^[2]。在骨髓基质细胞和 OB 的存在下, M-CSF 和 RANKL 分别与 OC 前体细胞上各自的受体结合并诱导其分化为成熟的 OC。

1997 年 Stimonet 等^[3]发现一种能抑制 OC 分化和增加骨密度的分子,命名为骨保护素(osteoprotegerin, OPG)。NF- κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)是 TNF 受体家族成员,为 I 型跨膜蛋白,主要功能是与 RANKL 的 C-端结合产生并传递信号,其胞内结构域有 383 个氨基酸,可与肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor-associated factor, TRAF)家族中的 TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 和 TRAF6 结合,介导信号的传导^[4]。OPG, RANK 和 RANKL 这 3 个因子在 OC 的活化、发育、衍变、激活、成熟过程中起了重要作用。当刺激因素作用于 OB/基质细胞,诱导其膜上表达 RANKL 分子,通过与 OC 前体细胞膜上 RANK 直接结合,将信号传入前体细胞,引起级联瀑布反应,使 OC 分化成熟,而 OPG 则由 OB/基质细胞旁分泌发挥作用,竞争性与 RANKL 结合,封闭 RANKL 与 RANK 的结合,抑制 OC 的分化,成熟。RANKL/OPG 浓度比是 OC 分化诱导的决定性因素^[5]。

二、MAPK 信号转导通路及其在破骨细胞中的作用

MAPK 是一类由脯氨酸介导的丝氨酸/苏氨酸

蛋白激酶,通过 VII 区域苏氨酸、酪氨酸双位点磷酸化活化。MAPK 通路是细胞内介导胞外刺激的信号转导通路之一,参与了细胞生长、发育、分裂、分化等多种细胞生理过程。目前,在哺乳动物细胞中已鉴定了 4 条 MAPK 信号转导通路:细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2, 又称 P42/44MAPK)、P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinase, P38)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNK, 又称 SAPK)和 ERK5。

MAPK 途径是通过保守的三级酶促级联反应传递信号,即 MAPK 激酶的激酶(MAP kinase kinase kinase, MAPKKK, 又称 MEKK)→MAPK 激酶(MAP kinase kinase, MAPKK, 又称 MKK)→MAPK^[6]。MAPK 通路还具有以下共同特征^[7]:① MAPK 磷酸化底物依赖于识别底物上与发生磷酸化的丝/苏氨酸氨基末端相连的脯氨酸残基;②某些信号分子具有多种生物功能或受到多种形式的调控;③通过膜招募、寡聚化和磷酸化调节 MAPKKK 活性。

1. ERK 通路

ERK 包括 ERK1 和 ERK2,是目前研究最透彻的一条 MAPK 信号转导通路,ERK 通路的激活是个酶促级联反应:生长因子与细胞表面的受体酪氨酸激酶结合,诱发生长因子受体胞浆中的酪氨酸残基自主磷酸化,导致受体二聚化与活化。磷酸化的酪氨酸残基可以为含有 SH2 结构域和酪氨酸磷酸化结合结构域的蛋白提供结合位点。生长因子受体结合蛋白 2(Grb2)是含有 SH2 结构域的适配体蛋白(adaptor protein),该蛋白可以通过 SH2 结构域与鸟嘌呤核苷酸交换因子(Sos)形成复合物。细胞表面的生长因子受体具有募集 Grb2 与 Sos 复合物的能力。Sos 与生长因子受体结合的过程中,移位至胞浆并与 Ras 相互作用,促进 Ras 与 GTP 结合,从而激活 Ras,成为具有功能活性的 Ras 蛋白。Raf 家族属于 MAPKKK,包括 A-Raf-1, B-Raf-1 有 C-Raf-1 三个蛋白激酶亚族。GTP 结合型的 Ras 蛋白与 C-Raf-1 结合, Ras 亦可活化 A-Raf-1 与 B-Raf-1。活化的 C-Raf-1 磷

酸化 MAPKK 的类的 MEK1 和 MEK2, 进而激活 ERK。ERK 激酶亦可磷酸化 C-Raf-1 和 MEK, 对其自身信号通路起负反馈调节作用。活化的 ERK 激酶移位到细胞核, 磷酸化活化一系列转录因子, 包括 Elk-1, SAP-1 α , c-Myc 等^[8]。概括起来就是: Rsa \rightarrow Raf \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK。

在 OC 中 ERK 通路扮演了怎样的角色呢? 2003 年 Faccio 等^[2]在研究整和素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 可能也促进 OC 形成时发现, 来源于 $\beta 3$ 基因敲除小鼠 ($\beta 3^{-/-}$) 的骨髓基质巨噬细胞 (bone marrow macrophages, BMMs) 在低剂量 M-CSF 下不能分化为 OC, 而在高剂量的 M-CSF 作用下却能分化为 OC, 但失去了吸收骨基质的功能。进一步研究发现, 高剂量的 M-CSF 与其膜受体 c-Fms 结合后, c-Fms 胞浆区域的第 697 位酪氨酸残基同 Grb-2 结合使 ERK 磷酸化, 活化的 ERK 最后通过上调 c-Fos 的表达而促进 OC 的分化。低剂量的 M-CSF 可能使 ERK 磷酸化作用持续时间较短, 但持续活化的 ERK 是 c-Fos 稳定表达所必须的^[9], 故低剂量 M-CSF 的刺激不能使其分化。另一有趣的发现是, 在 c-Fms 胞浆区域第 697 酪氨酸残基缺失而 $\beta 3 +/+$ 的 BMMs 同样可以分化为 OC, 可见 $\alpha\text{v}\beta 3$ 和 c-Fms 均是通过 ERK/c-Fos 通路介导 OC 的分化。而 Hotokezaka 等^[1]在实验中发现, 在加入 RANKL 的 RAW264.2 (一个鼠巨噬细胞系) 中, 中、高剂量的 ERK 特异性抑制剂可以加速和增加 RAW264.2 分化为 TRAP⁺ 的 OC 样细胞。上述研究结论的不一致, 可能原因是研究细胞类型差异, 细胞分化阶段不同及 ERK 激活的持续时间不同所致。

ERK 通路不仅对于 OC 的分化起了重要作用, 在促进 OC 的生存, 防止其凋亡方面也起了关键作用。Miyazaki 等^[10]证实①用抑制 Ras 活性的腺病毒 (dominant negative Ras, Ras^{DN}) 转染 OC 样细胞 (osteoclast-like cells, OCLs), 不仅抑制 ERK 活性且促进了 OCLs 的凋亡, 而用 MEK 抑制剂, PD98059 处理未转染的 OCLs 也有相似的结果; ②用持续激活的 MEK 腺病毒 (constitutively activate MEK1, MEK^{CA}) 转染 OCLs 能持续激活 ERK 并显著延长 OCLs 的存活, 有趣的是当 AxRas^{DN} 和 AxMEK^{CA} 共同转染 OCLs 后, AxRas^{DN} 促进 OCLs 凋亡的作用能被大大抵消; ③IL-1 也可迅速激活 ERK 促进 OC 的存活。另外, AxMEK^{CA} 转染的细胞, ERK 的持续激活导致 c-Fos, Fra-2, c-Jun 和 JunB 产量增加, 增强 Jun/Fos, Jun/Jun 同源, 异源二聚体的形成——活化蛋白 1 (activator protein, AP-1), 增加了 AP-1 与 DNA 的结合, 促进 OC 的生

存。

2. P38 通路

P38 是 Han 等^[11]用高渗和内毒素刺激小鼠肝脏细胞, 从中分离纯化出来的分子量为 38 kD 的酪氨酸磷酸化蛋白激酶。Ras 相关的 Rho 家族, 是一类 GTPase, 位于 P38 转导通路中 MAPKKK 之上, P21 激活的丝/苏氨酸激酶 (p21-activated kinases, PAK) 可以被 Rho 家族的 Cdc42 和 Rac1 激活, 进而活化 MAPKKK 类的混合谱系激酶 (mixed lineage kinase, TAK/ASK/MLK), 再把信号传递给 MAPKK 类的 MEKK3/6, 进而活化 P38, 活化的 P38 从细胞浆移位到细胞核, 磷酸化活化转录因子 ATF-2, Elk-1, CHOP10, MEF2C, Sap11, 还可活化 MAPK 激活蛋白激酶 2 与 3, 最终活化低分子量热休克蛋白^[12]。

2000 年, Matsumoto 等^[13]首次报道了在 RANKL 介导的 OC 的分化中, P38MAPK 起了重要作用。RANKL 与 RANK 结合后, 促进 MEK6 的磷酸化, 进而激活 P38MAPK, 活化的 P38 通过活化其下游底物 MAPK 激活蛋白激酶-2, 促进 OC 的分化。Li^[14]也在随后的研究中发现前 OC 中, 也存在着这么一条信号通路 RANKL + RANK \rightarrow MEK3/6 \rightarrow P38MAPK \rightarrow ATF2, 最终促进 OC 分化。

小眼相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 是一个螺旋-环-螺旋结构的亮氨酸拉链蛋白, 它可以通过与 OC 靶基因如: TRAP、组织蛋白酶 K 等启动子区域的一个 7 个碱基对的保守序列 TCANGTG 结合而调节 OC 的功能^[15]。Kim 等^[16]发现在前 OC 中, 活化的 P38MAPK 可促使 MITF 第 307 位丝氨酸磷酸化, 活化的 MITF 与 TRAP 的启动子结合, 促进 OC 的分化。可见, 在 RANKL 的作用下, P38MAPK 可以活化不同的下游靶因子, 促进 OC 的分化。

3. JNK 通路

同 P38MAPK 通路相似, Rho 家族通过受体酪氨酸激酶介导生发中心激酶 (germinal center kinase, GCK/NIK) 的活化, 而后依次激活 MAPKKK 类的 MEKK1/2/3/4, 和 MAPKK 类的 MEKK4/7, 最终活化 JNK, 使其从胞浆移位至胞核。JNK 的下游靶基因包括多种转录因子: ATF-2, Elk-1, C-Jun 等^[17]。

Yamamoto 等^[18]用抑制 MEKK7 活性的腺病毒转染 RAW264.7 细胞, 结果 JNK 活性明显抑制, NF- κ B 活性不受影响, TRAP⁺ 细胞的比例减少。另外, Srivastava 等^[19]发现未加 RANKL 的 RAW264.7 细胞内 JNK 活性很低, 使用 RANKL 刺激后尽管 JNK、

MEKK4 总量无变化,但 JNK 活性却增加了 10 倍。Mizukamid 等^[20]也观察到在 RANKL 作用下,TRAF6 被募集到 RANK 胞内区形成 RANK-RANKL-转化生长因子 β 激活激酶 1 (TAK1) 结合蛋白 2 (TAB2)-TAK1 复合物,其中 TAB2 是 TRAF6 和 TAK1 之间的连接蛋白,而 TAK1 属于 MAPKKK 家族,可进一步激活 JNK,活化的 JNK 能诱导 AP-1 活化,使转录因子 Elk-1 激活,c-Jun 磷酸化,调节 c-Fos 表达,从而前 OC 功能活跃,分化形成 OC。David 等^[21]还在实验中证实,在不依赖 c-Jun 磷酸化激活的情况下,JNK 可保护 OC 免受 RANKL 介导的前 OC 的凋亡,推测其可能机制:RANK 结合 TRAF2 后激活 JNK,而活化的 JNK 可以调节靶蛋白的稳定性,JNK 通过间接的调节 TRAF2 的稳定性而保护 OC 免受凋亡。上述均提示在 OC 的分化和其功能表达过程中,JNK 通路均起了重要作用。

三、几种常见因子对破骨细胞 MAP 通路的影响

当前有众多的研究者在该领域观察胞外信号对 OC 功能的影响,并着重探讨此过程中 MAPK 的作用。发现有多种因素参与此过程,这些因素包括生长因子、细胞因子、激素等。其中研究较多的有: TGF- β , TNF- α , IL-1 和雌激素等。TGF- β 在单核细胞中通过激活 P38MAPK 促进 OC 的生成,但若用 TGF- β 持续作用,则可通过下调 RANK 的表达而减弱 RANK-RANKL 的信号通路,阻止 OC 的生成^[22]。TNF α 和 IL-1 均可通过激活 JNK 而促进 OC 的分化^[21]。FGF-2 可与 OC 细胞膜上其受体 FGFR1 结合,上调 ERK1/2 的磷酸化水平,使组织蛋白酶 K 和 MMP-9 表达增加,骨吸收陷窝形成增多^[23]。雌激素和雄激素均可通过抑制 JNK 的活性,减少 c-Fos 和 c-Jun 的表达水平,使其同 DNA 的结合减少,最终抑制 RANKL 介导的 OC 的分化^[19,24]。

OC 的分化及其正常功能的发挥就是这么一个涉及多因素多信号转导通路的复杂的过程。

四、展望

通过研究 MAPK 信号转导通路在 OC 增殖分化乃至凋亡中的作用,为深入探讨 MAPK 通路在骨形成、代谢中的作用提供了重要的线索,对进一步了解其在代谢性骨病的发生、发展和治疗中的作用开辟了新途径。

目前,虽然对 MAPK 信号转导通路及其生物学效应已有了较多的认识,但对于它在 OC 中与非 MAPK 转导通路存在着怎样的相互作用以及各种信号通路之间既独立又交叉的联系如何进行等等,这

一系列的问题无疑需要进一步的研究和探索。

参 考 文 献

- 1 Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, et al. U0126 and PD98059 specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW 264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 47366-47372.
- 2 Faccio R, Takeshita S, Zallone A, et al. c-Fms and $\alpha\beta$ integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J Clin Invest*, 2003, 111: 749-758.
- 3 Simonet WS, Lacey OL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89 (2): 309-319.
- 4 Bryant G, Aarnay, Valsala Haridas, et al. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- κ B (RANK). *J Biol Chem*, 1998, 273: 20551-20555.
- 5 Wahara N, Ide T, Saito N, et al. Propentofylline potentiates induced ischemic tolerance in gerbil hippocampal neurons via adenosine receptor. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18: 472.
- 6 Hagmann C, Blank JI. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal*, 2001, 13: 863-875.
- 7 Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 2001, 81(2): 801-809.
- 8 Jelinek T, Catling AD, Reuter CW, et al. RAS and RAF-1 form a signaling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 8212-8218.
- 9 Murphy LO, Smith S, Chen RH, et al. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. 2002, 4: 556-564.
- 10 Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, et al. Reciprocal role of ERK and NF- β B pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol*, 2000, 148: 333-342.
- 11 Han J, Lee JD, Bibbs L, et al. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 1994, 265 (5173): 808-811.
- 12 Janknecht R, Hunter T. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1 α . *EMBO*, 1997, 16: 1620-1627.
- 13 Matsumoto M, Sudo T, Saito T, et al. Involvement of P38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). *J Biol Chem*, 2000, 275 (40): 31155-31161.
- 14 Li X, Udagawa N, Itoh K, et al. P28MAPK -mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology*, 2002, 143: 3105-3113.
- 15 Mansky KC, Marfatia K, Purdom GH, et al. The microphthalmia transcription factor (MITF) contains two N-terminal domains required for transactivation of osteoclast target promoters and rescue of mi mutant osteoclasts. *J Leukoc Biol*, 2002, 71: 295-303.
- 16 Kim C, Sankar U, Han J, et al. Microphthalmia transcription factor is a target of the P38MAPK pathway in response to receptor activator of NF- κ B ligand signaling. *J Biol Chem*, 2002, 277(13): 11077-11083.
- 17 Constant SL, Dong C, Yang DD, et al. JNK1 is required for T cell-mediated immunity against *Leishmania major* infection. *J Immunol*, 2000,

(下转第 343 页)

第4个月时因跌倒而发生股骨颈骨折需住院治疗,但ALN并未中断,在治疗6个月后各部位的骨密度都有明显的增高。有1例患者因呼吸系统疾病加重回老家治疗而退出研究。

经口服ALN治疗后,骨密度增高,肺功能也得到改善,其中治疗后 FEV_1 及 $FEV_1\%$ 与治疗前相比有显著性,而 FEV_1/FVC 有升高但差异没有显著性,可能与 FEV_1 提高的同时FVC也得到相应的提高有关。相关分析结果显示, FEV_1 变化值与腰椎MBD变化值之间呈正相关,提示用ALN治疗在骨量增高的同时肺功能也得到改善。因此,COPD患者骨质疏松的药物治疗是非常必要和有效的。

Dpd/Cr是尿中游离脱氧吡啶啉与尿肌酐的比值,是一种反映骨吸收的理想指标^[8],其变化反映了骨转换过程中的骨吸收程度。本组病例治疗后血清ALP水平和晨尿Dpd/Cr值均明显降低,同时血清骨钙素值却有所升高,提示ALN治疗COPD骨质疏松的机理是抑制破骨细胞活性以抑制骨吸收,降低骨转换率。

服药期间主要副作用为上消化道症状,均发生在服药的早期,无需停药可自行缓解,1例有一过性的转氨酶升高,副作用的总发生率为18.4%,没有发现严重的毒副作用,因此ALN短期服用是安全的。此外,ALN服用方便,每天仅1次,容易为病人所接受。

总之,我们认为,骨质疏松是威胁COPD患者的严重并发症,需要引起临床医生的高度重视。阿仑膦酸钠是治疗COPD合并骨质疏松症的安全有效的药物,可明显提高骨密度,同时发现对肺通气功能的改善有益,特别适用于病情较重或有骨折的患者,但其长期疗效和安全性有待进一步观察。

参 考 文 献

- 1 Shane E, Silverberg SJ, Donovan D, et al. Osteoporosis in lung transplantation candidates with end-stage pulmonary disease. *Am J Med*, 1996, 101:262-269.
- 2 Iqbal F, Michaelson J, Thaler L, et al. Declining bone mass in men with chronic pulmonary disease: contribution of glucocorticoid treatment, body mass index, and gonadal function. *Chest*, 1999, 116:1616-1624.
- 3 Incalzi RA, Caradonna P, Ranieri P, et al. Correlates of osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 2000, 94: 1079-1084.
- 4 WHO Study Group: WHO Technical Report Series, 843. Geneva: World Health Organization, 1994, 5.
- 5 慢性阻塞性肺疾病诊治指南. *中华结合和呼吸杂志*, 2002, 25: 453-460.
- 6 McEvoy C, Ensrud K, Bender E, et al. Association between corticosteroid use and vertebral fractures in older men with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157:704-709.
- 7 钢锐,董天华.阿仑膦酸钠与雌激素对实验性骨质疏松作用的比较. *中华老年医学杂志*, 1998, 17:76.
- 8 刘冰等.尿脱氧吡啶啉排泄率在绝经后骨质疏松症中的临床监测意义. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8:34-36. (收稿日期:2003-10-15)

(上接第379页)

- 165(5):2671-2676.
- 18 Yamaoto A, Miyazaki T, Kadono Y, et al. Possible involvement of I κ B kinase 2 and MEKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor of nuclear factor κ B ligand. *J Bone Miner Res*, 2002, 17:612-620.
 - 19 Srivastava S, Torablo G, Weitzman MN, et al. Estrogen decrease osteoclast formation by down-regulation receptor of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem*, 2001, 276:8836-8840.
 - 20 Mizukami J, Takaesu G, Akatsuka H, et al. Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol*, 2002, 22:992-1000.
 - 21 David JP, Sabapath K, Hoffmann O, et al. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and-independent mechanisms. *J Cell Science*, 2002, 115:4317-4325.
 - 22 Karsdal MA, Hjørth, Henriksen K, et al. Transforming growth factor- β control human osteoclastogenesis through the P38MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem*, 2003, 278(45):44975-44987.
 - 23 Chikazu D, Hakeda Y, Ogata N, et al. Fibroblast growth factor (FGF)-2 directly stimulates mature osteoclast function through activation of FGFR1 and P42/44MAP kinase. *J Biol Chem*, 2000, 275(42): 31444-31450.
 - 24 Huber DM, Bendixen AC, Pathrose P, et al. Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor. *Endocrinology*, 2001, 142(9):3800-3808.
- (收稿日期:2003-10-29)

本杂志社新地址:

北京市朝阳区望京西园311楼101室 邮编:100102(北京9910信箱)电话:64705247